

A291

**METHOD FOR PREPARING NEW PREPARATION FOR ANTICANCER AGENT**

Patent Number: JP5221852  
Publication date: 1993-08-31  
Inventor(s): TAKENAGA MITSUKO; others: 02  
Applicant(s): L T T KENKYUSHO:KK  
Requested Patent:  JP5221852  
Application Number: JP19920079418 19920218  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A61K9/107; A61K47/24  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PURPOSE:**To improve the selective toxicity of an anticancer agent against cancer and the safety of the agent for administered patients, and further to prevent the metastasis of the cancer and treat the metastasized diseased site by accelerating the lymphatic system transfer of the anticancer agent.

**CONSTITUTION:**A new method for preparing an anticancer agent is characterized by dissolving a fat-soluble anticancer agent in a medium chain or long chain fatty acid ester forming the cores of lipid microspheres, adding a surfactant such as phospholipid to the solution and subsequently homogenizing the mixture for coating the surfaces of the fine particles of the lipid not miscible with water to stabilize the produced lipid microspheres. The above-mentioned object can be achieved by the preparation method.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-221852

(43) 公開日 平成5年(1993)8月31日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 9/107	A D U E	7329-4C		
47/24	H	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数7(全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平4-79418

(22) 出願日 平成4年(1992)2月18日

(71) 出願人 391043055

株式会社エルティーティー研究所

神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1

(72) 発明者 武永 美津子

川崎市宮前区菅生2丁目30番1号

(72) 発明者 五十嵐 理慧

川崎市多摩区南生田3丁目3番12号

(72) 発明者 水島 裕

東京都世田谷区梅丘1丁目1番11号

(54) 【発明の名称】 制ガン剤の新規製剤調製方法

(57) 【要約】

【目的】 制ガン剤のガンに対する選択毒性及び投与される患者に対する安全性を向上させるとともに、制ガン剤のリンパ系移行を促進することによるガンの転移予防並びに転移病巣の治療。

【構成】 脂溶性制ガン剤をリピッドマイクロスフェアのコアをなす中鎖ないし長鎖脂肪酸エステルに溶解し、リン脂質のような界面活性剤を加えてホモジナイズして、水と混和しない脂質の微少粒子表面を被覆することにより、生成したリピッドマイクロスフェアを安定化させることを特徴とする制ガン剤の新規製剤化方法。この製剤化方法により上記の目的を達成することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 水に難溶ないし不溶の制ガン活性を有する化合物を、中鎖ないし長鎖脂肪酸エステルに溶解し、さらにリン脂質を加えて懸濁した後、安定化剤としてグリセリンなどの糖類を含む水を加えてホモジナイズし、安定な懸濁液とすることを特徴とするガン治療用新規製剤の調製方法。

【請求項2】 請求項1のリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルトリセロール、フォスファチジン酸、カルジオリピン、グリセリルエーテル型リン脂質、フォスファチジルイノシトール及びスフィンゴミエリンなどであることを特徴とするガン治療用新規製剤の調製方法。

【請求項3】 請求項1の中鎖ないし長鎖脂肪酸エステルが、炭素数8から22までの直鎖飽和ないし不飽和脂肪酸のエステルであることを特徴とするガン治療用新規製剤の調製方法。

【請求項4】 請求項1の中鎖ないし長鎖脂肪酸エステルが、各種のグリセライド、エチレングリコール、プロピレングリコールなどの多価アルコールエステル或いはエタノール、イソプロピルアルコールなどの低級脂肪族アルコールのエステルであることを特徴とするガン治療用新規製剤の調製方法。

【請求項5】 制ガン性化合物を安定化させるため、中鎖ないし長鎖脂肪酸エステルに $\alpha$ トコフェロール、ビタミンA、カロチノイド或いはBHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated hydroxytoluene) などの天然ないし合成抗酸化剤を添加することを特徴とするガン治療用新規製剤の調製方法。

【請求項6】 請求項1～4の制ガン活性化合物が、水には難溶ないし不溶であるが、中鎖ないし長鎖脂肪酸エステルに溶解し、リン脂質、安定剤及び水を加えてホモジナイズすると、安定なリピッドマイクロソフェアーを形成する性質を有する化合物であることを特徴とするガン治療用新規製剤の調製方法。

【請求項7】 植物油に可溶で水に難溶ないし不溶の制ガン性化合物400mgを大豆油10gに溶解し、卵黄レシチン1.2gを加え、ポリトロンタイプのホモジナイザーに留水90mlとグリセリン2.5gを加えて、90℃で20分間2万回転でホモジナイズして予備乳化する。この乳化液を数回フレンチプレス型ホモジナイザーに通過させることにより、平均粒子径0.2 $\mu$ mのリピッドマイクロソフェアーに制ガン剤が封入された安定な乳濁液(4mg/ml)のガン治療用新規製剤の調製方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】 本発明は制ガン剤、とりわけ脂溶性制ガン剤の新規製剤方法に関する。

## 【産業上の利用分野】

【0002】 本発明は、ガンの化学療法剤に関するもの

である。わが国では各種の死亡原因の中でも悪性腫瘍による死亡が、心疾患及び脳血管障害のそれを追い抜き、死亡原因のトップにおどりでてから既に10年以上も経過している。そしてこの傾向は、本格的な高齢化社会を迎える今後も続く予測されている。一般にガンは不治の病と認識され、恐怖の的になっているので、悪性腫瘍に対する優れた化学療法剤を求める研究は、世界的な広がりを持ち、薬物による悪性腫瘍の克服は、人類の悲願といえることができる。制ガン性化合物を探索する資源としては、微生物ないし植物由来の天然有機化合物から、有機合成された有機化合物に至るまで、その種類は広範囲を網羅し、選出された化合物は、膨大な数にのぼり、化学構造的にも多彩に変化に富んでいる。

## 【従来の技術】

【0003】 これまで数多くの制ガン剤が開発され、実用に供されてきたが、ガン治療の現状はその制圧からはほど遠い。それというも、現行の制ガン剤を人体に投与してガン細胞を殺滅できる投与量と、重篤な副作用を発現する量とが接近していて、治癒させるだけの量を使うことが難しいからである。副作用の中でも最大の問題は、ほとんどの制ガン剤が強い骨髄抑制(白血球減少)作用を示すことである。従って、制ガン剤の選択毒性を高め、副作用を低減させる製剤化方法の研究は、ガン化学療法研究者にとって、最高の課題といえることができる。さらに、ガンが恐れられる理由は、体内の各所に転移巣を形成することである。ガン細胞は、血行性に転移することはまれで、ほとんどの場合リンパ系を伝わって転移する。そこでリンパ系への転移を抑制する薬剤なり、方法が開発されれば、ガンはさほど恐ろしい病気ではなくなる可能性がある。ガン化学療法研究における主要なテーマは、①ガン細胞に対し選択毒性を高める研究、②副作用を低減する研究、③ガン細胞の転移を抑制する研究に尽きる。制ガン剤のスクリーニングが開始されてから、既に30年以上が経過し、この間に膨大な数の化合物がテストされたが、ごく一部の例外を除けば、その成果は微々たるものであった。従って、この先スクリーニングテストを続けたところで、薬効及び安全性の両面で現行の制ガン剤をはるかに凌駕する新しい制ガン剤が出現する確率は、それほど高くない。現行薬剤の剤形改良及び投与方法検討などからのアプローチは、新規制ガン剤の探索と並び、ガン制圧のための有力な手段である。しかし、上記の三大目標が、製剤方法の研究から一挙に達成できるとは、夢想だにされていなかった。

【0004】 本発明者らは、ガン化学療法剤の中でも、水に難溶ないし不溶の制ガン剤(以下このような制ガン剤を脂溶性制ガン剤と呼ぶことにする)を研究の対象とした。一口に脂溶性の制ガン剤と言っても、生物活性面及び物理化学的な特性が異なる多くの化合物が含まれている。人体に投与する薬物に望まれる性質としては、第一に水に溶解易いことがあげられる。注射による薬物投

3

与は、投与された全量が体内に送り込まれ、全身を循環するので、薬効が最も発現し易いからである。一方、水に溶け難い薬物を注射剤として活用するためには、界面活性剤或いは有機溶媒を使い、均一に水に分散して注射剤とする場合が多い。しかも、これらの溶解補助手段を使えるのは、ごく一部の限られた化合物に過ぎず、大部分の脂溶性薬物は、注射とは別の経路、すなわち、経口、経皮、経直腸（座薬）、経鼻、経気管支などの経路から体内に吸収させ、薬効を発現させる方策が採用される。大部分が強い細胞毒である制ガン剤であっても、この点は例外でない。

【0005】脂溶性制ガン剤は、点滴を含め注射剤としての製剤化が難しい。経口的に投与する場合でも、強い細胞毒である制ガン剤が、細胞分裂の旺盛な消化管粘膜から高濃度で吸収されるため、粘膜上皮細胞に多大の障害を与える。従って、制ガン剤の経口投与は、下痢、悪心及び嘔吐など消化管系の副作用が頻発する。

【0006】さらに制ガン剤に共通の欠点は、臨床効果が発現する投与量と中毒量とが、きわめて接近していることである。このことを逆に言えば、制ガン剤を投与しても、重篤な副作用が伴わない場合には、事実上無効のことが多い。従って、より有効な新しい制ガン剤の探索と並んで、既存制ガン剤の副作用を低減させ、ガン細胞を選択的に死滅させる新しい剤形の開発は、以前から求められていたのである。

【0007】本発明者は、先に高カロリー輸液の一形態である脂肪乳剤に、プロスタグランジンE<sub>1</sub>のような脂溶性薬物を溶解すると、①既存剤形と比べ、同一の薬効を発現させる薬物量が著しく低下すること、②薬効が持続すること、③副作用発現率が低下することなどを見出した。脂肪乳剤中に含まれる中性脂肪の微粒子、リピッドマイクロスフェアに、プロスタグランジンE<sub>1</sub>を溶け込ませた製剤は、末梢血管に循環障害を有する患者に投与され、臨床症状の改善に大きな成果をあげている。

【0008】脂溶性制ガン剤の一系統に、ニトロソ尿素系制ガン剤（Carter SK 編集：Proceedings of the 7th New Drug Seminar: Nitrosoureas. Cancer Treat Rep 1976; 60: 645）がある。代表的なニトロソ尿素系制ガン剤としては、BCNU（carmustine）、CCNU（lomustine）、メチルCCNU（semustine）などがあり、この系統は、作用機作上からアルキル化剤に分類されている。しかし、同じアルキル化剤であっても、ビスクロロエチルアミン系及びアジリジン系アルキル化剤とは交差耐性を示さない。ニトロソ尿素系制ガン剤は、糖誘導体であるため水溶性のストレプトゾトシン及びクロロゾトシンのような例外もあるが、概して高度に脂溶性であり、そのため脳血液関門を通過することがで

4

きると言われ、脳腫瘍にも効果が認められる場合がある。この系統はDNAにクロスリンキングを生じさせるために、抗腫瘍作用を発揮する。しかも、一般の制ガン剤と異なり盛んに分裂増殖しているガン細胞より、静止期の細胞に対し毒性が強い特徴がある。

【0009】マイトタン（mitotane）も脂溶性の制ガン剤である。この物質は殺虫剤DDTの誘導体で高度に脂溶性であるため、本来は人体用薬物としては不適格であった。しかし、偶然、副腎皮質の悪性腫瘍に対して特異的に強い阻止効果を示すことがわかり（Hutter A M and Kayhoe D E: Adrenal cortical carcinoma: Results of treatment with o, p' DDD ub 138 patients. Am J Med 1966; 41: 572）制ガン剤として実用化されるようになった。

【0010】タモキシフェン（tamoxifen）は、いわゆる抗女性ホルモンに属する脂溶性物質である。この物質はエストロジェンの拮抗阻害剤であり、女性ホルモン感受性の正常組織或いは腫瘍、例えば、乳ガンの細胞質内女性ホルモン受容体に結合し、女性ホルモンの結合を阻止することにより、その作用を阻害する（Tamoxifen Workshop. Cancer Treat Rep 1976; 60: 1409）。このような作用特性のため、タモキシフェンは、女性ホルモン受容体をもつ乳ガンの治療にさいし、経口投与で頻用されている。

【0011】制ガン性抗生物質にも脂溶性であるがゆえに、臨床応用が著しく制約されている例がみられる。その反面、逆に副作用が頻発した水溶性の制ガン性抗生物質が、副作用の頻度が劇的に低下した脂溶性誘導体によって代わられた例も知られている。例えば、ダクチノマイシン群（dactinomycin）は、放線菌が産生する抗生物質としては、最も初期にその抗腫瘍活性が明らかにされた。この群には数多くの同族体が含まれ、動物実験では優れた抗腫瘍活性を示すものが多いが、①水に難溶であること、②組織刺激性が強く、ヒトの皮膚に高濃度の溶液が接触するだけで激しい炎症を起こす、③静脈注射時には強い血管痛がある（血管痛を急速に散らすため、多量の生理食塩水で血管をフラッシュする必要ある）、などの理由でほとんど活用されず、実用化に向けた検討はまったくなされていない。アドリアマイシンに代表されるアンスラサイクリン系抗生物質（Young R C et al: The anthracycline antineoplastic drugs. N Engl J Med 1981; 305: 139）は、遊離塩基が水に難溶である。この系統は、優れた抗腫瘍活性をもっているが、心筋に対する毒性が強いため、用途が著しく限定されてきた。しかし、誘導体化して物性を変えたり、或いはリピッドマイクロスフェ

5

アーに溶解させ、各組織への分配を変化させれば、心筋に対する毒性を軽減させることが可能かも知れない。そのような可能性を示唆する好例が、プレオマイシンに脂溶性を付与したペプレオマイシンである。プレオマイシンは、扁平上皮ガンに対し優れた制ガン効果を発揮するが、治療の過程で致命的な肺の線維化を起こすため、適応症及び用量に著しい制約があった。しかし、プレオマイシンに脂溶性基が導入されたペプレオマイシンは、肺の線維化が軽減されたため、副作用の発現頻度を有意に低下させることに成功している。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】上記の実例が示すように、薬物を人体に投与する際には、その薬効を最高に発揮させ、かつ、副作用を最少に抑えるために、製剤の剤形、投与経路、及び投与方法など、薬効及び副作用に影響を及ぼす多くの要因を検討し、総合的に判断して最適の製剤形態及び投与条件を選ばなければならない。ほとんどが強い細胞毒性をもつ制ガン剤の場合には、特にそのような検討が必要である。本発明は、制ガン剤に必然的に付随すると考えられてきた副作用を最小限に抑え、薬効を高める制ガン剤の新しい製剤化方法に関するものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】制ガン剤の効果を高め、副作用発現を最小限に抑制する最良の手段は、ガン細胞を選択的に殺滅する剤形及び投与方法を見いだすことにある。本発明者らは、脂溶性制ガン剤をリピッドマイクロスフェア中に溶解し、脂肪乳剤として投与すると、①制ガン剤の効果が著しく高まること、②副作用の発現頻度が有意に減少すること、及び③制ガン剤の体内分布がリンパ指向性に変化し、ガン細胞のリンパ節転移を著明に抑制することを発見し、本発明を完成した。本発明で薬物の担体として活用されるリピッドマイクロスフェアは、高カロリー輸液用脂肪乳剤に含まれる微小油滴である。コアをなす中性脂肪の微細な油滴（直径1.0 μm以下）表層が、リン脂質により被覆されたりリピッドマイクロスフェアは、種々の方法により調製することができるが、一般的にはフレンチプレス型ホモジナイザーを用い、油状の中性脂肪、リン脂質及び水を攪拌しつつ、高い圧力の下で微細なノズルから噴出させることにより調製される。このように調製したリピッドマイクロスフェアは、室温で数年放置しても乳化状態を保持するほど安定性が高い。本発明者らの構想は、このリピッドマイクロスフェアを、生体内で脂溶性制ガン剤を運搬する担体として活用し、ガン細胞に特異的に取り込ませることにより、正常組織への影響を極力軽減することであった。活発に分裂増殖しているガン組織は、正常組織と比べて代謝回転が速やかであり、エネルギー需用が大きい。従って、代謝エネルギー供給の役割を担うリピッドマイクロスフェアは、正常組織よりガン組織に多

6

く取り込まれることが期待されるからである。本発明では、微小油滴を被覆するリン脂質として、制ガン作用及び抗ウイルス作用が知られたグリセリルエーテル型リン脂質をも使用することができる。また、動脈硬化を予防作用を示す魚油の脂肪酸、エイコサペンタエノイン酸(EPA)は、マウスの移植腫瘍において、ガンに随伴する悪液質を予防する作用が報告されている(S A Beck, K L Smith, M J Tisdale, Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. Cancer Research 51:6089-93, 1991)。本発明の方法に従えば、EPAを多量に含む魚油を制ガン性化合物の担体として、人体に投与可能なリピッドマイクロスフェアを調製することができる。しかも、リピッドマイクロスフェアに封入した制ガン剤は、静脈内に投与した場合でも、直接血管壁と接触しないので、ダクチノマイシンを直接投与した場合に惹起される局所の炎症及び血管痛とは無縁である。それに加え、ガン組織特異性を高めるために、油滴を被覆するリン脂質の皮膜に種々の修飾を施すことも可能である。例えば、in vitroでエイズウイルス増殖抑制効果があり抗腫瘍効果を示すことから、米国並びに欧州で臨床試験が行われているグリセリルエーテル型リン脂質は、本発明でも利用可能である。また、ガン細胞特異抗原を認識する抗体をリン脂質皮膜に埋め込めば、リピッドマイクロスフェアはガン細胞を認識して、特異的にガン細胞を破壊することができる。

【0014】事実、ニトロソ尿素系制ガン剤、BCNUをリピッドマイクロスフェア内に溶解し、L-1210担ガンマウスに静脈内投与すると、BCNU対照と比べ著しい生存期間の延長効果が認められた。また、ダクチノマイシンをエールリッヒ固形ガンを移植したddYマウスに腹腔内投与したところ、リピッドマイクロスフェアに封入した場合は、対照と比べ約20分の1の投与量で同等の固形腫瘍発育阻止効果が認められた。

【0015】脂溶性制ガン剤をリピッドマイクロスフェアとして製剤化する利点は、次のように要約できる。  
①効力増強：リピッドマイクロスフェア粒子は、正常組織よりエネルギー消費が活発なガン組織に多量に取り込まれるので、ガン組織は正常組織より制ガン剤蓄積が高まる。  
②正常組織に対する毒性軽減：リピッドマイクロスフェア表層は、無毒のリン脂質であり、内部の脂溶性制ガン剤は正常組織と直接接触しないので、副作用が発現しにくい。  
③リンパ節転移抑制効果：つまり、リピッドマイクロスフェア化することにより、制ガン剤のリンパ指向性が高まり、制ガン剤のリンパ液濃度が上昇するので、ガン細胞のリンパ節転移が抑制される。  
④悪液質予防：EPAを多量に含む魚油を制ガン制化合物

を溶解する担体を利用することにより、末期ガン患者にみられる悪液質を改善する作用を併せ持つ製剤とすることができる。⑤表層の機能性：微小油滴を被覆するリン脂質としてグリセリルエーテルリン脂質のように、抗ウイルス性及び抗腫瘍性脂質を活用することができる。

【0016】リポソームやリビッドマイクロスフェアの体内動態を決定づける因子としては、粒子径、電荷及び被覆している膜の構成成分などがあることが知られている。体内に投与すると、これらの微小粒子の多くは、網内系に集積されるので、抗腫瘍効果を高めるためには、網内系への移行をできるだけ回避する方策が重要とされてきた。リポソームは、粒子系を小さくすることにより、網内系への移行が回避できることがわかっている。一方、本発明により、リビッドマイクロスフェアは、リポソームとは生体内動態を異にすることが示唆された。すなわち、リビッドマイクロスフェア化することにより薬効が増強され、副作用の発現が抑制されるからである。このことは、リビッドマイクロスフェアが網内系に異物として認識され食食される経路とは別に、血液中のリボ蛋白粒子と融合し、エネルギー源として末梢組織に摂取されるのが、主要代謝経路であることを示唆している。さらに、脂溶性制ガン剤をリビッドマイクロスフェアとして投与した場合には、リンパ指向性が高まる結果、腫瘍細胞のリンパ系への転移が強く抑制されることが明らかにされた。この事実は、脂溶性制ガン剤のリビッドマイクロスフェアが、ガン細胞の転移抑制にも有用であることを示唆したものとして、大きな意義を有する。

【0017】これまで述べてきたことから明らかなようにリビッドマイクロスフェアは、脂溶性薬物を全身投与する場合には、他に比肩するものがないほど優れた薬物担体である。リビッドマイクロスフェアは、一般的に常温で液状の植物油と卵黄レシチンを水とともにホモジナイズすることにより製造される。しかし、本発明におけるリビッドマイクロスフェアは、この製法に限定されず、生体に悪影響を及ぼさない常温で油状の有機物、ステロイド化合物、界面活性剤及びタンパク質を組み合わせて使用することができる。

【0018】制ガン剤についても、本出願に実施例としてあげた制ガン剤に限定せず、広く一般に水に難溶ないし不溶の制ガン活性を有する化合物に適用することができる。さらにリビッドマイクロスフェアに封入された脂溶性制ガン剤を、長期にわたり安定化させるためには、油相に少量の $\alpha$ トコフェロールなどの抗酸化剤を加えることも好ましい。以下、実施例をあげるが、本発明はこれらの実施例に拘束されるものではない。

【0019】

【実施例1】カルムスチン(BCNU)400mgを大豆油10gに溶解し、卵黄レシチン1.2gを加え、ポ

5分間15000回転でホモジナイズする。さらに注射用蒸留水90mlとグリセリン2.5gを加えて、90℃で20分間2万回転でホモジナイズして予備乳化する。終わりに、この乳化液をアミコン社製のFrench Pressure Cell Pressに5回通過させ、平均粒子径0.2 $\mu$ mのリビッドマイクロスフェア封入カルムスチン乳濁液(4mg/ml)が得られる。

【0020】

【実施例2】ダクチノマイシン2.5mgを0.5%の $\alpha$ トコフェロールを含有する10gのコーン油に溶解し、卵黄レシチン1.2gを加え、ポリトロンタイプのホモジナイザーを用い、温度90℃で5分間1万回転でホモジナイズする。さらに注射用蒸留水90mlとグリセリン2.5gを加えて、90℃で20分間2万回転でホモジナイズして予備乳化する。終わりに、この乳化液をアミコン社製のFrench Pressure Cell Pressに5回通過させ、平均粒子径0.2 $\mu$ mのリビッドマイクロスフェア封入ダクチノマイシン乳濁液(25 $\mu$ g/ml)が得られる。

【0021】

【実施例3】マイトタン(mitotane)500mgを2%の $\alpha$ トコフェロールを含有する10gのサフラワ油に溶解し、大豆レシチン1.2gを加え、ポリトロンタイプのホモジナイザーを用い、温度90℃で5分間1万回転でホモジナイズする。さらに注射用蒸留水90mlとエチレングリコール2.5gを加えて、90℃で20分間2万回転でホモジナイズして予備乳化する。

終わりに、この乳化液をアミコン社製のFrench Pressure Cell Pressに5回通過させ、平均粒子径0.2 $\mu$ mのリビッドマイクロスフェア封入マイトタン乳濁液(5mg/ml)が得られる。

【0022】

【実施例4】タモキシフェン遊離塩基(tamoxifen)1gを2%の $\alpha$ トコフェロール及び0.1%のオレイン酸を含有する10gのオクチルデシルトリグリセライドに溶解し、卵黄レシチン1.0gとフォスファチジルイノシトール0.2gの混合物を加え、ポリトロンタイプのホモジナイザーによって、温度90℃で5分間1万回転でホモジナイズする。さらに注射用蒸留水90mlとプロピレングリコール2.5gを加えて、90℃で20分間2万回転でホモジナイズして予備乳化する。終わりに、この乳化液をアミコン社製のFrench Pressure Cell Pressに5回通過させ、平均粒子径0.2 $\mu$ mのリビッドマイクロスフェア封入タモキシフェン乳濁液(10mg/ml)が得られる。

【0023】

【実施例5】6週令のCDF1雄性マウスをランダムに9群に分け(n=10~11)、腹腔内にL-1210

白血病細胞を $2.5 \times 10^6$ 個移植した(day 0)。カルムスチンによる治療は、移植2日目から開始し、6日目までの5回、カルムスチンの生理食塩水溶液投与群(free-BCNU)を対照として、リビッドマイクロスフェア封入カルムスチンを静脈内投与して生存日数を比較した。なお、リビッドマイクロスフェア封入カルムスチンは、平均粒径200nm(lipo-BCNU)及び平均粒径50nm(small lipo-BCNU)の二つを調製し、相互に薬効を比較した。表1にカルムスチン、3及び10mg/kg投与群\*10

\*の生存日数を、それぞれの対照群と対比して示した。ちなみに、薬剤の代わりに生理食塩水を投与した対照群の生存日数は、 $7.08 \pm 0.27$ 日(mean  $\pm$  SD)であった。さらに担体のリビッドマイクロスフェアのみを静脈注射し、平均生存日数への影響をしらべたが、200nm粒子の場合が7.36日、50nm粒子で7.18日で、生理食塩水対照群のそれとの間に有意差はなかった。

【0024】

【表1】

【表1】  
表1. カルムスチン(BCNU)・リビッドマイクロスフェアの制ガン活性

薬剤	投与量(mg/kg)	生存日数	平均値 $\pm$ SD <sup>1)</sup>	% ILS <sup>2)</sup>
生理食塩水対照群	-	7 x 11, 8 x 1	7.08 $\pm$ 0.27	-
BCNU/VE 3 <sup>*)</sup> 7/10/17/17-(0.2 $\mu$ m)対照群 <sup>3)</sup>	-	7 x 10, 11	7.38 $\pm$ 1.20	4
BCNU/VE 3 <sup>*)</sup> 7/10/17/17-(0.05 $\mu$ m)対照群 <sup>4)</sup>	-	7 x 9, 8 x 2	7.18 $\pm$ 0.38	1
BCNU対照群	3	7 x 3, 8 x 6, 9 x 1	7.8 $\pm$ 0.60	10
	10	12 x 1, 13 x 5, 14 x 4	13.3 $\pm$ 0.64	88
BCNU/VE 3 <sup>*)</sup> 7/10/17/17-(0.2 $\mu$ m)	3	7 x 1, 8 x 4, 9 x 4, 10 x 1	8.5 $\pm$ 0.81	20
	10	16 x 1, 17 x 2, 18 x 4, 19 x 3	17.9 $\pm$ 0.94	152
BCNU/VE 3 <sup>*)</sup> 7/10/17/17-(0.05 $\mu$ m)	3	8 x 9, 10 x 1	9.1 $\pm$ 0.80	28
	10	17 x 4, 18 x 2, 19 x 2, 20 x 1, 24 x 1	18.6 $\pm$ 2.06	163

<sup>1)</sup>標準偏差、<sup>2)</sup>%increase in life span. <sup>3)</sup>平均粒径0.2 $\mu$ m、<sup>4)</sup>平均粒径0.05 $\mu$ m  
Student unpaired t-testによる統計処理: ①BCNU対照群、8mg/kg vs. BCNU/VE 3<sup>\*)</sup> 7/10/17/17-(0.05 $\mu$ m), P<0.001; ②BCNU対照群 10mg/kg vs. BCNU/VE 3<sup>\*)</sup> 7/10/17/17-(0.2 $\mu$ m) 10 mg/kg群, P<0.001; ③BCNU対照群 10mg/kg vs. BCNU/VE 3<sup>\*)</sup> 7/10/17/17-(0.2 $\mu$ m) 10 mg/kg群, P<0.001;

【0024】カルムスチン3mg/kg投与群の生存日数は、free-BCNU群で7.8日、lipo-B

CNU群で8.5日、small lipo-BCNU群で9.1日で、対照群と比べ有意な生存期間延長効果が認められた。しかも、free-BCNU群とsmall lipo-BCNU群との間には、Student unpaired t-testで統計処理すると、危険率0.1%以下の水準で有意差があり、粒子系の小さい製剤は、通常の方法と比べ抗腫瘍効果が格段に優れていることが明らかになった。さらに、10mg/kg投与群の平均生存日数は、free-BCNU群が13.3日、lipo-BCNU群が17.9日、small lipo-BCNU群で18.6日であり、free-BCNU群と両lipo-BCNU群との間には、危険率0.1%以下の水準で有意差が認められた。しかし、いずれの投与量でも、lipo-BCNU群とsmall lipo-BCNU群の間には、生存日数に関して有意差がなかった。

#### 【0025】

【実施例6】脂溶性制ガン剤をリビッドマイクロスフェア化して投与した場合、同一量を投与した対照と比べ、著しく毒性が軽減される事実を確認するため、実施例5で腫瘍死したマウスを病理解剖し、剖見所見を記録した。free-BCNU群では、腹水の貯留とリンパ節肥大、小腸の癒着が全例にみられたが、両lipo-BCNU群では腹水の貯留はみられるものの、リンパ節肥大と小腸癒着はほとんど認められなかった。腹水貯留は、腫瘍細胞が腹腔内で増殖した際、普遍的にみられる現象であり、静脈内に投与されたlipo-BCNUの腹腔内濃度が、L-1210細胞の増殖を阻止するほど高まるとは考えにくい。従って、free-BCNU群と両lipo-BCNU群との間に、腹水貯留について大きな差がみられなかったことは当然といえよう。しかし、小腸の癒着は、明らかにBCNUの細胞毒性に関連した副作用であり、両lipo-BCNU群に癒着が認められなかったことは、同じ投与量でありながら両lipo-BCNU群では小腸壁のBCNU濃度が、癒着を起こすほど高まらなかったことを示唆している。一方、両lipo-BCNU群でリンパ節の腫脹がみられなかったことは、lipo-BCNUがL-1210のリンパ節転移を抑制したことを示唆しているものと思われる。すなわち、BCNUをリビッドマイクロスフェア内に包埋することにより、BCNUのリンパ系移行が大きく促進された可能性が高い。脂溶性制ガン剤をリビッドマイクロスフェアに包埋した製剤の利点は、次のように要約できる。

①効力増強：リビッドマイクロスフェア粒子は、エネルギー源として正常組織より代謝回転が速やかな組織に活発に取り込まれるため、BCNUの濃度が正常組織より高まる。

②毒性極限：正常組織に対する毒性を軽減できること、つまり、リビッドマイクロスフェアは正常組織と直接

接触しないので、副作用が発現し難い。

③リンパ指向性：制ガン剤の生体内分布に変化が起こり、リンパ指向性が高まる。

#### 【0026】

【実施例7】体重約20gのCDF<sub>1</sub>雄性マウス40頭をランダムに4群に分け、第1群は生理食塩水を0.2ml静脈内に投与し、残りの3群は、一日あたりBCNUを30mg/kgづつ5日間連続して静脈内投与し毒性試験を実施した。第2群の剤形は、BCNUのオリーブ油溶液、第3群の剤形は、平均粒径0.2μmのリビッドマイクロスフェアに封入したBCNU、第4群の投与剤形は、平均粒径0.05μmのリビッドマイクロスフェアに封入したBCNUである。投与群間の比較では、投与2日目からの体重減少が著しく、オリーブ油溶解BCNU群では10日目から、lipo-BCNU群及びsmall lipo-BCNU群では、15日ないし16日目から生存率が低下した。マウスは30日間飼育し、死亡率及び平均生存日数(mean±SD)を求めた。は、オリーブ油溶解群が、死亡率100%、平均生存日数13.7±2.73日、lipo-BCNU群がそれぞれ70%、>20.85±5.01日、small lipo-BCNU群が60%、>22.04±6.29日であった。死因は、いずれの群においても、BCNUの全身的な毒性に起因する衰弱死と思われる。平均生存日数については、オリーブ油溶解BCNU群と両lipo-BCNU群との間には、危険率0.1%以下の水準で有意差が認められた。BCNUの投与量が等しいにもかかわらず、死亡率及び平均生存日数に違いがみられた原因は、free-BCNUが直接的に体内の正常組織と接触・浸透して、傷害を与えるのに対し、両lipo-BCNUでは、正常細胞にリビッドマイクロスフェアが取り込まれさえしなければ、組織に直接的な傷害を与えない点にあるものと思われる。

#### 【0027】

【実施例8】5週令のddy系雄性マウス、60頭をランダムに10群に分け、エールリッヒ腹水ガン細胞、2×10<sup>6</sup>個を右ソケイ部皮下に移植した。第1~4群は、ダクチノマイシン投与群、第5~8群はリビッドマイクロスフェア化ダクチノマイシン投与群、第9~10群はそれぞれのピークル投与対照群とした。薬剤投与は、移植24時間後から開始し、一日一回連続5日間、ダクチノマイシンないしそのピークルを対照として静脈内に投与した。なお、ダクチノマイシンは、10%プロピレングリコール含有イオン交換水に溶解した。リビッドマイクロスフェア化ダクチノマイシンは、実施例2の方法で調製した。マウスは、飼料及び飲料水を自由に摂取させて飼育し、移植2週間後に固形腫瘍を摘出して重量を測定した。その結果は、表2に示すとおりである。

#### 【0028】



【表2】

表2. ダクチノマイシン/リピッドマイクロスフェア製剤の抗腫瘍作用

製剤	投与量(mg/kg)	腫瘍重量(mg)	阻止率(%)
溶液*	2.0	0.38	63
	1.0	0.45	58
	0.5	0.74	28
	0.25	0.91	12
リピッド・マイクロスフェア-	0.4	0.31	75
	0.2	0.47	64
	0.1	0.69	47
	0.05	0.98	25
溶液対照	0.0	1.03	-
リピッド・マイクロスフェア- 対照	0.0	1.31	-

【0029】表2から明らかなように、ダクチノマイシン2mg/kgを静注した場合の腫瘍阻止率は63%で、リピッドマイクロスフェア化ダクチノマイシン0.1mg/kgの阻止率64%と匹敵する結果だった。

【0030】

【発明の効果】本発明の新規製剤化方法に従って調製された脂溶性制ガン剤製剤は、静脈内に投与した場合、従来の方法で製剤化された脂溶性制ガン剤と比べ、①ガン

に対する選択毒性が高まり、②副作用発現率の低下、及び③リンパ指向性の増大によるガンの転移阻止作用の強化などの特徴を有する。さらに、微小油滴の周囲を被覆するリン脂質及び中心部コアの油滴に機能性を与えることにより、ガン治療効果を高めることができる。本発明は、すべての水に難溶ないし不溶の制ガン活性化化合物に適用できる新規で普遍的な製剤方法である。